バイオ技術を組み込んだファインケミカルズの製造

詫 摩 勇 樹*・上 田 誠**・春 日 優 三*

Development of Organic Fine Chemicals by Combining Microbial and Chemical Reactions

Yuki TAKUMA*, Makoto UEDA** and Yuzo KASUGA*

Some organic fine chemicals have been developed by a combination of microbial and chemical processes. These combination processes make the production more simple, cost-effective, and environmentally friendly. The process of 6-chloro-3-aminomethylpyridine was established by incorporating the regioselective microbial hydroxylation of 3-cyanopyridine and the improved reduction of 6-chloro-3-cyanopyridine with modified Raney Nickel catalysts. Production of ethyl (*R*)- β -hydroxy- γ -cyanobutylate has been achieved via microbial asymmetric reduction of chloroacetoacetate. A novel method of 2-cyanopiperazine that includes a Michael addition of ethylenediamine to 2-chloroacrylonitrile, followed by an intramolecular cyclization, was found, and its application for the chiral piperazine derivatives *via* biotransformation is now under development.

Key words: Combination process, Microbial reaction, Regioselective hydroxylation, Modified Raney Nickel, Asymmetric reduction

はじめに

最近、特に欧米においてファインケミカルズの市場が活発化している¹⁾。そして、この市場が伸びるにつれ製造の分業化の現象が起きている。いわゆる、特定顧客からの注文生産ケミカルズ(Custom Chemicals)である。カスタムケミカルズには製造における優位性、環境問題解決のための技術の革新(Technology innovation)が必要とされ、従来のファインケミカルズの製造(コスト勝負)の考えとは大きく異なっている。三菱化学では、10数年前よりファインケミカルズの製造を手がけてきた。ここ数年来の医薬品メーカーのアウトソーシングの動き

に合わせ標的化合物は医薬バルク、あるいは医薬中間体(カスタムケミカルズ)に絞られつつある。最近、これらカスタムケミカルズ製造における優位性、あるいは環境問題の解決からバイオ技術を組み込むことでいくつかの成功を納めている。これらのためには(各社固有の戦略があると思うが)、1)合成工程の短縮化(反応ルートの設計)、2)反応収率(選択性)の大幅向上、3)環境問題の極力少ない反応(プロセス)の開発等が必須である。言うまでもないが、既存ルートの改良だけでは大きな合理化は期待できない。有機合成研究者にとって、高い競争力かつ高い排他性を持つ新規な合成ルートの開発が急務であり、有機合成方法論研究における使命でもある。

本稿では、本事業の先駆けとなったクロロピリジン誘導体の開発を中心に、いかにしてラボにおける合成から工業的生産を可能にしたか、すなわち合成ルートの探索から始まり、製造ルートの決定、さらには実際に直面した問題とその解決策等について紹介したい。

1. ファインケミカルズ開発の例

1.1. クロロピリジン誘導体(バイオ技術組み込み)

約7年前、合成ピレスロイド系の次に来る次世代殺虫剤としてクロロニコチル系の化合物が世界的に注目を集

* 三菱化学(株)黒崎事業所技術開発センター

()

** 三菱化学(株)横浜総合研究所生物化学センター

()

* Mitsubishi Chemical Corporation, Kurosaki Plant Technology Development Center ()

()

** Mitsubishi Chemical Corporation, Reserch and Development Division, Yokohama Reserch Center Biochemicals Laboratory ()

()

めた。この期待は裏切られることなく、水稻、果樹、野菜などの幅広い作物の主要害虫防除に優れた効果を発揮し、さらなる適用拡大、混合剤開発が進められてきた。現在、数種の同様な剤が上市されており、大型商品となっている。

このクロロニコチル系化合物のキー中間体は、6-クロロ-3-アミノメチルピリジン(CPMA と略称)である。文献調査結果を図1に示したが、出発物質は安価なピコリンもしくはニコチン酸(NA と略称)である。ポイントになる点は6位への選択的クロロ原子の導入方法と3位の変換方法と考えられた。6位への塩素化の予備検討としてピコリン誘導体の塩素化を種々検討したが(例えば光塩素化等)、文献の域を越える優位性は見いだされなかった。一方NA のバイオによる6位の選択的酸化は既知であり反応成績も良好である²⁾。そこでNA より安価で化学的変換が容易な3-シアノピリジン(3CP と略称)を出発原料にすることを考えた。予備検討では、NA の場合と同様に高選択的に6位の酸化が可能であるとの画期的発見がなされ、本格検討に着手することができた。

とは言え、初期の基本戦略がそのまま達成された訳ではない。バイオ反応により6-ヒドロキシ-3-シアノピリジン(CHP と略称)が高選択的に得られることが判明したため、共通前駆体である6-クロロ-3-クロロメチルピリジンに誘導すべく6-ヒドロキシ-3-ヒドロキシメチルピリジンへの変換、すなわちシアノ基のヒドロキシメチル化を検討した。詳細は割愛するが、触媒としてパラジ

ウムカーボンを用い、適当な酸の存在下で比較的良好に変換できることが判明した³⁾。しかし、このものの単離精製が極めて困難であったことに加え、次に誘導される共通中間体6-クロロ-3-クロロメチルピリジンの安全性(皮膚浸透性が強く、エイムズ陽性)に問題があると判明したため、初期の3つあったターゲット化合物を基本骨格であるCPMA に絞り込み、以下の本格検討に入った。

1.1.1. バイオ技術による CHP の合成

3CP から CHP 生産菌を弊社保有のタイプカルチャーおよび自然界からの分離微生物からスクリーニングした。多くの微生物はニトリル変換酵素活性を持つことから⁴⁾、本スクリーニングにおいてはニトリル変換酵素活性を持たず3CP 水酸化活性を持つ微生物の効率的スクリーニング手法の開発がポイントであった。その結果、活性微生物取得の一般的方法である集積培養法(反応原料3CP の資化菌)ではニトリル変換酵素活性を持つ菌が多く取れ、3CP 耐性菌を分離すると望みの変換酵素活性のみを持つ微生物が効率よく取得できることがわかった。約4600株のスクリーニング菌株の中から最も活性の高い菌株として、MCI-2848 株を選択した。本菌株は、栄養学的、化学的分類により *Comamonas testosteroni* MCI-2848 株と同定した⁵⁾。

しかしながら、本菌株の CHP 生産性は非常に低く(10 g/L/40 時間)、工業化へは不十分なレベルであった。そこで、培養条件を検討することにより菌体中の酵素活性を増大することを試みた。本酵素活性は酵素活性誘導剤

Fig.1 Synthetic route of 6-chloro-3-aminomethylpyridine.

を培地中に添加することにより活性が発現する誘導酵素である。本来の基質である NA を培地に添加することにより活性が発現するが、NA は発現する酵素活性により 6-ヒドロキシニコチン酸(HNA と略称)に変換される。HNA は酵素活性誘導効果が低いため十分な酵素タンパクが培養中に合成できないことが推論された。そこで、種々のニコチン酸アナログを培地中に添加し、本菌株を培養することにより効果的な酵素活性誘導剤の探索を行った。表 1 に示したように、6-クロロニコチン酸(CNA と略称)または 6-フルオロニコチン酸を添加することにより酵素活性は飛躍的に増大することを見いだした⁶⁾。6 位ハロゲン置換ニコチン酸が酵素活性誘導剤として優れている理由は、NA の 6 位がハロゲンでブロックされているために、本酵素による分解を受けず、培養中に誘導活性が継続するためと推定している。

6-フルオロニコチン酸は高い酵素活性誘導性能を示したが、エイズ陽性であったため、以後の検討は CNA を用いた。最も高い活性は 2.5 g/L の CNA を添加したときに得られた。酵素活性誘導剤の発見により生産性は約 4 倍向上した。また、3 g/L 以上の CNA を添加すると本菌株の増殖を阻害した。

次に、本酵素反応の反応条件を検討した。反応液中に NA あるいは HNA を添加することにより反応速度が増大することを見いだした⁷⁾。表 2 に示したように 10 mM の HNA を添加することにより生産性は 1.5 倍に向上した。この現象の理由ははっきりしないが、HNA はニコチン酸水酸化酵素のタンパク安定化効果があることと関

連があるのではないかと推測している⁸⁾。

本酵素の至適 pH は 7.2、反応温度は 30 °C であった。20 g/L 以上の 3CP が系中に存在すると反応速度が低下するため、3CP を反応液中に逐次添加し、15 g/L 前後にコントロールする必要があることが判明した。

これまでに、最適化した培養条件、反応条件を用い CHP の生産を試みた。30 °C で 3CP を 20 g/L に制御しながら反応を行うことにより、30 時間で 57.2 g/L の CHP の蓄積に成功した。残存 3CP は 5.5 g/L で、添加した 3CP に対し収率 90%、選択率 100% であり、反応途中から反応系は白濁が見られた。

反応終了後、反応液に NaOH を添加し、pH をアルカリ性(pH=10)にすると生成した CHP は溶解し遠心分離により反応液から菌体を除去する。除菌後、硫酸を添加し pH を 5 とすることにより CHP は析出し、容易に高純度の白色針状結晶を得ることができた。

1.1.2. CHP の塩素化

α -ヒドロキシピリジンの塩素化は古典的によく知られた反応であり、オキシ三塩化リンを過剰に用いることで容易に目的とする 6-クロロ-3-シアノピリジン(CCP と略称)が得られる。しかし、取り出しの際シアノ基が一部加水分解されることおよび大量のリン廃水が生成することから、工業的製法として採用するには問題があった。

そこで、ホスゲンによる塩素化を試みた。ホスゲンはその高い毒性から一般的にはあまり適用されず、その結果この種の反応の応用例も少ない。結果を表 3 に示したが、ホスゲン単独では反応は進行せず、触媒としてジメチルホルムアミドのような酸アミド化合物を用いることにより良好に反応は進行し、高収率かつ高純度の CCP が得られることがわかった⁹⁾。本法はホスゲンに限らず入手容易で扱いやすい塩化チオニルでも同様に適用で

Table 1 Effect of inducer.

Inducer	Activity(%)	Inducer	Activity(%)
-	40	HNA	45
3CP	9	CNA	452
NA	100		

Table 2 Effect of additive.

Additive	Activity(%)
-	100
(5mM)	159
(5mM)	153
(10mM)	161

Table 3 Results of chlorination.

CHP		CCP			
Run.	Reagent	Solv.*	Condition	Conv.	Yield
1	POCl ₃ (4MR)	-	90°C, 1hr	96%	85%
2	↓ (2MR)	-	↓	99%	87%
3	↓ (1.5MR)	TL	110°C, 2hr	70%	28%
4	SOCl ₂ (1.5MR)	↓	↓	~0%	~0%
5	↓	↓	100°C, 2hr DMF:0.2MR	99%	94%
6	COCl ₂ (1.5MR)	↓	↓	99%	98%

*Amount of solv;5V/W-CHP

き、工業的製法として採用することが可能となった¹⁰⁾。

1.1.3. CCP の還元

一般的にシアノ基のアミノメチル基への還元反応は膨大な研究例が報告されており、シアノピリジンも例外ではない¹¹⁾。しかしながら、この化合物では6位のクロロ基の還元脱離が予想され、いかに選択的に3位のシアノ基を還元するかがポイントであった。文献調査では、ラネーニッケル触媒を用いる方法がバイエルより報告されているが、表4に示したように反応収率は60%程度と良好な結果ではなかった¹²⁾。ここで問題となったのは、CPMAの熱安定性が悪いいため蒸留分離が極めて困難となる、すなわち大量の高沸点化合物の生成によりCPMAが収率良く蒸留単離できないという事実である。筆者らは、ラネーニッケルに焦点を当て、収率を向上すべく改良検討を行うこととした。

筆者らは種々の条件でラネーニッケルを調製し、反応に適用してみた。その結果を表5に示した。触媒活性

(フェノール水添活性を指標とした)を500まで低下させ、かつ活性点を増やす(触媒の粒径や沈降速度が指標)ことにより劇的に収率を向上させることに成功し¹³⁾、続く蒸留分離の負荷を軽減することができ、工業的にCPMAを製造することが可能となった。

また、本プロセスではバイオ反応工程と有機合成工程をドッキングすることで新たな問題が生じた。バイオ反応工程から混入してくる微量な蛋白質により塩素化反応が阻害を受け、次の還元工程では蛋白質混入によりCCP中の残留硫黄分が増加し触媒が被毒されるという問題も生じた。我々は、バイオ反応工程での目的物を単離する際の蛋白質量を規制することで好結果を得ている。

以上の検討を基に1995年から本格製造に推移したが、現在まで順調に生産を続けている。

1.2. β-ヒドロキシ酪酸誘導体(不斉バイオ技術組み込み)

次に、バイオ技術の組み込みが成功したものとして、β-ヒドロキシ酪酸誘導体がある。反応スキームを図2に示す。目的の中間体は(R)-β-ヒドロキシ酪酸エチルエステルであり、この化合物は高脂血症薬(Atorvastatin)へ誘導される¹⁴⁾。

二段目の不斉還元については、不斉触媒還元法と競合する工程(他社により種々検討された)であるが¹⁵⁾、生産性、安全性、コスト等の点でバイオ法が勝っているようである¹⁶⁾。今後、不斉触媒還元法の巻き返しが懸念されるところである。

本プロセスもクロロピリジン誘導体の開発同様、種々のトラブルを克服し、現在本格生産中である。

1.3. 2-置換ピペラジン誘導体(バイオ検討中)

近年、2位に置換基を有するピペラジン骨格を適用した医薬品の開発が盛んである¹⁷⁾。特にメルク社のHIV-1 protease inhibitorであるCrixivan®に代表されるようにN-tert-ブチル-2-ピペラ

Table 4 Effect of catalyst.

Run	Cat.	Cat. (g/g-CCP)	NH ₃ (eq.)	Temp. (°C)	Time (hr)	CCPconv. (%)	CPMA (%)	AMP (%)	imine ₂ (%)
1	R-Ni	1.0	4	r. t.	5	100	57	4	19
2	R-Co	1.0	4	r. t.	5	50	11	-	tr
3	5%Pd/C	1mol%	4	r. t.	5	100	-	69	5
4	5%Rh/Alumina	1mol%	4	r. t.	5	47	-	-	tr
5	R-Ni, Mo	1.0	4	r. t.	5	100	12	-	78

Reaction condition; Solvent: EtOH, NH₃: 28% NH₃ soln, H₂ press: Normal.

Table 5 Results of reduction with modified catalyst.

Cat.	Activity	Size (mesh)	Al cont. (%)	Sediment. rate (cm/sec)	CCPconv. (%)	CPMA (%)	AMP** (%)
Aldrich	-	-	-	-	100	57	4
Kawaken Fine	600	150	5.0	1.92	100	37	2
*R-100	1000	150	6.9	0.75	100	71	22
R-101	850	150	4.4		100	79	15
R-200	1000	150	7.8		100	73	10
R-205	740	150	6.0		100	80	11
R-205C	490	150	6.2	0.55	100	85	7
R-205C1	400	150	5.9	0.45	100	88	4
R-205C2	390	200	5.7		100	86	4
R-205C3	420	200	5.2		100	89	6

* R series: Nikko Rika.

** 3-Aminomethylpyridine.

Reaction condition; Solv: EtOH, Cat: 1.0g/g-CCP, Temp: r.t. NH₃: 4eq, H₂ press: Normal.

Fig.2 Synthesis of atorvastatin.

Fig.3 Synthetic route of piperazine derivatives.

ジンカルボキサミドがキー中間体として重要である。この合成法を図3に示した。各社固有の戦略を持って独自の合成法を確立している。

我々は、種々のルート探索の結果、全く新規なピペラジン環構築法を見いだした。安価なアクリロニトリルから2-クロロアクリロニトリルを合成し、次にエチレンジアミンと縮合し2-シアノピペラジンを経由する方法である¹⁸⁾。この製法を基に工業化を実施中である。一方、

まだ工業化には至っていないが、光学活性体を合成する手段として微生物学的な分割法も検討し、選択性に優れた酵素を取得している。

おわりに

以上のように、筆者らは有機中間体のターゲットとして取り上げたクロロピリジン誘導体を始め、いくつかのファインケミカルズの開発に成功し、実生産まで漕ぎ着

けることができた。今回の成功の要因を挙げると、第一に新規なルートを創出したこと、そして第二にラボ研究から実生産までを短期間で成し得たことである。また、背景としての確にビジネスチャンス タイムリーに捉えたことも否めない。繰り返しになるが、開発で重要なことはコスト競争力の高い新規なルートを短期間で確立することである。筆者らは、バイオ技術を取り込むことでそれが可能であることを実証することができた。何でもバイオ技術を取り込めば良いというわけではないが、化学合成が不得意な反応をバイオ反応で達成できれば(今回の2つの事例がまさしくそうであるが)、反応ルート探索において新規ルート発見の可能性が大いに広がることを改めて認識した。近年ますますキラル化合物が増加している状況からみても、バイオ技術を組み込むことはファインケミカルズ開発において大きな戦略となるのは間違いないところであろう。また、今後はバイオ技術のみならず研究開発の高度化に向けたRoboticsの適用あるいは合成経路デザインプログラムの適用も、その効果が大いに期待されるところである。

最後に、本研究開発は社内の多数の研究者の努力に加え、社外における多数の皆様のご協力により達成されたものであり、ここに心から深く感謝いたします。

(平成11年1月27日受理)

文 献

- 1) S.C. Stinson, "CUSTOM CHEMICALS", FEBRUARY 3, 1997C & EN
- 2) (a) P. Lehky, EP 0152948; (b) B. Hurh, M. Ohshima, T. Yamane, T. Nagasawa, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 382 (1994)
- 3) 詫摩勇樹, 春日優三, 関根真波, 坂口浩人, 田中健, 特開平 平 7-224037
- 4) Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183 (1982)
- 5) M. Yasuda, T. Sakamoto, R. Sashida, M. Ueda, Y. Morimoto, T. Nagasawa, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 572 (1995)
- 6) 上田誠, 安田磨理, 坂本剛, 森本裕紀, 特開平 平 6-319575
- 7) 上田誠, 安田磨理, 坂本剛, 森本裕紀, 特開平 平 6-197781
- 8) B. Hurh, T. Yamane, T. Nagasawa, *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 19 (1994)
- 9) 春日優三, 田村光彦, 渡辺直道, 特開平 平 7-206821
- 10) 詫摩勇樹, 春日優三, 松本正志, 渡辺直道, 特開平 平 8-053418
- 11) R.L. Augustine, "Catalytic Hydrogenation", Marcel Dekker, 94 (1965)
- 12) F. Maurer, DE 3726993
- 13) 詫摩勇樹, 関根真波, 田中健, 特開平 平 8-053417
- 14) バトラー・ドナルド・ユージーン, リー・トウン・パン, 特表平 平 8-507521
- 15) 三橋茂, 桜井和俊, 雲林秀徳, 特開平 平 5-331128
- 16) 山岸正博, 上田誠, 高井幸恵, 特開平 平 8-336393
- 17) (a) R. Kai, WO 9521162; (b) M.A. Bruce, D. R. St. Laurent, G.S. Poindexter, I. Monkovic, S. Huang, N. Balasubramanian, *Synth. Commun.*, **25**, 17, 2673 (1995); (c) B. Aebischer, P. Frey, H-P. Haerter, P.L. Herrling, W. Mueller, H.J. Olverman, J.C. Watkins, *Helv. Chim. Acta*, **72**, 1043 (1989); (d) C.F. Bigge, S.J. Hays, P.M. Novak, J.T. Drummond, G. Johnson, T.P. Bobovski, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 39, 5193 (1989)
- 18) 詫摩勇樹, 春日優三, 宮崎剛喜, 特開平 平 9-87254